

IMPACT DES ANTIBIOTIQUES SUR L'AXE MICROBIOTE- INTESTIN-CERVEAU AU DÉBUT DE LA VIE ET RISQUE POUR LE NEURODÉVELOPPEMENT

EARLY-LIFE IMPACT OF ANTIBIOTICS ON THE MICROBIOTA- GUT-BRAIN AXIS AND RISK FOR NEURODEVELOPMENT

Cassandra MOREL¹ 

Manuscrit initial reçu le 27 novembre 2024, manuscrit révisé reçu le 17 janvier 2025 et accepté le 20 janvier 2025, révision éditoriale le 7 juillet 2025

Communication présentée le 12 septembre 2024 lors de la séance thématique de l'Académie vétérinaire de France
« Communication entre le microbiote intestinal et le cerveau »

RÉSUMÉ

L'exposition à des antibiotiques à large spectre, couramment utilisés durant la période périnatale, est un des facteurs de modification de l'assemblage et de la maturation du microbiote intestinal. Plusieurs études épidémiologiques ont d'ailleurs corrélé une exposition aux antibiotiques à des altérations du microbiote et des problèmes comportementaux chez l'enfant, suggérant un lien entre colonisation microbienne et développement du cerveau pendant cette période de la vie. Néanmoins, les conséquences d'une exposition aux antibiotiques sur le neurodéveloppement sont encore aujourd'hui mal comprises chez l'Homme, et peu d'études chez l'animal ont examiné cet impact dans des conditions cliniquement pertinentes. Dans ce contexte, l'objectif de notre étude était de comprendre les effets d'un traitement maternel à l'ampicilline chez la souris, pendant une fenêtre périnatale étroite, sur la composition du microbiote intestinal, la physiologie et le neurocomportement de la progéniture.

Mots-clés : antibiotique ; microbiote intestinal ; neurodéveloppement ; comportements socio-émotionnels

ABSTRACT

Broad-spectrum antibiotics are the most frequently used drugs in the perinatal period, and it is now well established that early-life antibiotic exposure is one of the factors influencing the assembly and maturation of the infant gut microbiota. Several epidemiological studies have correlated antibiotic exposure around birth with alterations of microbial seeding and neurobehavioral impairments in children, suggesting a link between early gut colonization and brain development. However, it is unclear whether antibiotic exposure could influence neurodevelopmental outcomes in human, and few preclinical studies have examined their potential impact in clinically relevant conditions. In this context, the goal of our study was to explore the effects of a maternal ampicillin exposure during a narrow perinatal window in mice on the gut microbiota composition and neurobehavioral outcomes in the offspring.

Keywords: antibiotics; gut microbiota; neurodevelopment; socio-emotional behaviors

1- PhD, INSERM, UMRS1139, 3PHM, Université de Paris, Paris, France
E-mail : Cassandra.Morel@u-paris.fr



CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Le microbiote intestinal désigne l'ensemble des micro-organismes qui peuplent le tractus digestif, et inclue notamment des bactéries, des champignons, des virus et des archées. Il comprend presque autant de cellules microbiennes que l'hôte compte de cellules humaines eucaryotes (Sender *et al.* 2016) et regroupe environ 8 millions de gènes, soit au moins 300 fois plus de gènes que le génome humain (Li *et al.* 2014). Nombre de ces gènes bactériens codent pour des enzymes que l'hôte ne peut pas synthétiser lui-même. Elles interviennent par exemple dans la dégradation des fibres alimentaires, la synthèse de vitamines ou d'acides aminés (Rowland *et al.* 2018), ce qui fait de notre microbiote un « organe » à part entière dans la régulation de l'homéostasie intestinale et du métabolisme. Au cours du développement, la colonisation microbienne du tractus digestif est indispensable pour la maturation du système immunitaire et de la physiologie intestinale (Dieterich *et al.* 2018 ; Zheng *et al.* 2020). Depuis une vingtaine d'années, il a été bien établi que le système nerveux central (SNC) et le microbiote intestinal s'influencent de manière bidirectionnelle, le long d'un axe récemment nommé « axe microbiote-intestin-cerveau » (Cryan *et al.* 2019). La recherche préclinique, notamment celle utilisant l'animal de laboratoire axénique (animal totalement dépourvu de micro-organismes et élevé en conditions stériles), a permis de découvrir que le microbiote intestinal contribuait à des processus-clés du neurodéveloppement tels que la neurogénèse, la formation de la gaine de myéline, ou la maturation de la barrière hémato-encéphalique (Cryan *et al.* 2019). Aussi, l'absence totale de microbiote conduit à une réduction du comportement de type anxieux et à une hyperactivité chez la souris (Neufeld *et al.* 2011 ; Diaz Heijtz *et al.* 2011), suggérant que la colonisation microbienne est essentielle pour le développement cérébral et le comportement chez l'animal. Chez l'Homme, la colonisation et la diversification du microbiote intestinal au début de la vie coïncident avec des étapes-clés du neurodéveloppement (Borre *et al.* 2014), montrant qu'il existe une fenêtre temporelle critique pendant laquelle le microbiote intestinal pourrait influencer le développement cérébral humain. Pendant cette période critique, des facteurs de risque environnementaux pour l'assemblage et la maturation du microbiote intestinal du jeune enfant, tels que le mode d'accouchement ou l'exposition périnatale aux antibiotiques à large spectre, ont été identifiés (Diaz Heijtz 2016). Or ces médicaments sont les plus fréquemment utilisés pendant cette période de la vie (Neuman *et al.* 2018). Dans ce contexte, plusieurs études épidémiologiques (Firestein *et al.* 2019 ; Slykerman *et al.* 2019 ; Lavebratt *et al.* 2019 ; Njotto *et al.* 2023) ont corrélé une exposition précoce aux antibiotiques à des altérations du microbiote et des troubles neurocomportementaux tels que ceux rencontrés dans les troubles du spectre autistique (TSA). Ces études indiquent donc des effets potentiellement délétères des antibiotiques sur le développement de l'axe microbiote-intestin-cerveau. Cependant, les conséquences d'une exposition aux antibiotiques sur le neurodéveloppement sont encore aujourd'hui mal comprises chez l'Homme, et peu d'études chez l'animal ont étudié cet impact dans des conditions cliniquement pertinentes.

Dans ce contexte, l'objectif de l'étude présentée ici (Morel *et al.* 2023) est de déterminer, chez la souris, l'impact potentiel d'une exposition périnatale à l'ampicilline pendant une courte période, c'est-à-dire de la dernière semaine de gestation jusqu'aux trois premiers jours de la vie, sur (i) la composition du microbiote fécal de la progéniture, (ii) ses comportements socio-émotionnels au début de la vie, (iii) l'expression de gènes associés à ces comportements et à l'intégrité des barrières physiologiques de l'axe microbiote-intestin-cerveau (Figure 1).

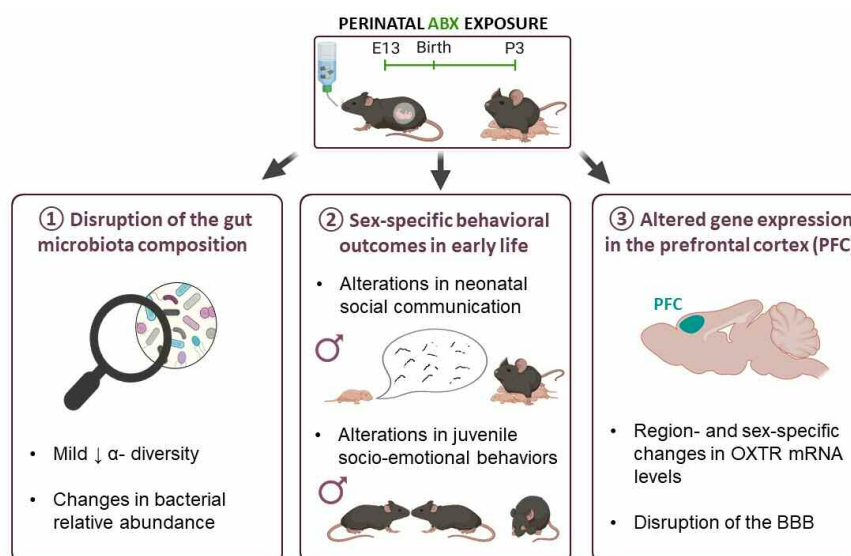


Figure 1. Résumé graphique des résultats de Morel *et al.* (2023), obtenus chez la souris après une exposition maternelle à l'ampicilline pendant une fenêtre étroite de la période périnatale. Dans cette étude, l'exposition de la mère à un antibiotique (ABX), l'ampicilline, pendant la période périnatale (du jour embryonnaire [E] 13 au jour postnatal [P] 13), entraîne diverses modifications physiologiques et neurocomportementales chez la progéniture pendant les périodes néonatale et juvénile : la composition du microbiote intestinal est perturbée (1), la communication sociale par ultrasons (USV) en période néonatale et les comportements socio-émotionnels en période juvénile sont altérés, de manière plus marquée chez les mâles que chez les femelles (2). Ces altérations comportementales sont associées, dans le cortex préfrontal (PFC), à une réduction significative de l'expression du récepteur de l'ocytocine (OXTR) et à des modifications d'expression génique suggérant une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BBB) (3).



LA PERTURBATION DU MICROBIOTE MATERNEL PAR L'AMPICILLINE ALTÈRE LE MICROBIOTE DE LA PROGÉNITURE

Il avait été préalablement démontré qu'une exposition à l'ampicilline pendant la gestation, à une dose cliniquement pertinente (c'est-à-dire 1 mg/mL/jour en prise orale) induisait des perturbations dans la composition du microbiote intestinal maternel chez la souris (Arentsen 2017). De telles altérations semblent être transmises verticalement à la progéniture puisque, dans notre étude, des modifications du microbiote fécal des petits sont visibles dès le stade prépubère, soit 4 semaines environ après l'arrêt du traitement antibiotique chez la mère (Figure 2). Les microbiotes fécaux des petits issus de mères exposées aux antibiotiques sont moins riches (Figure 2A) et tendent à être moins diversifiés (Figures 2B et 2C) par rapport à leurs homologues témoins, mais uniquement chez les femelles. Par ailleurs, l'exposition périnatale aux antibiotiques entraîne chez les deux sexes une augmentation de l'abondance relative des genres *Akkermansia* et *Parabacteroides* et une diminution de l'abondance relative du genre *Alloprevotella*. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que les abondances relatives de ces trois genres bactériens sont aussi altérées chez les patients atteints d'autisme (Iglesias-Vázquez *et al.* 2020) ainsi que dans des modèles murins de TSA, tels que la souris BTBR *tp3tff/J* (Golubeva *et al.* 2017). Par exemple, *Akkermansia muciniphila*, une espèce indispensable dans la physiologie intestinale de l'hôte, contribuerait également au fonctionnement du SNC puisque son administration en tant que probiotique est suffisante pour rétablir l'expression du facteur neurotrophique BDNF, améliorer les concentrations circulantes de dopamine et de sérotonine et diminuer la suractivation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien dans un modèle murin présentant des comportements de types anxieux et dépressif (Sun *et al.* 2023). Ces travaux suggèrent donc que les genres *Alloprevotella*, *Parabacteroides* et *Akkermansia* peuvent être une cible d'intérêt dans l'étude du développement et du fonctionnement de l'axe microbiote-intestin-cerveau et, plus particulièrement, dans la compréhension des troubles du neurodéveloppement. Une étude préclinique récente (Arentsen *et al.* 2017) a d'ailleurs démontré que le même traitement périnatal à l'ampicilline, de la dernière semaine de gestation aux trois premiers jours postnataux, induisait une réduction de l'expression de gènes de risque de l'autisme, *Bdnf* et *Met* (facteur de signalisation cellulaire), chez la souris, indiquant une influence du microbiote intestinal précoce dans le développement et la fonction de régions cérébrales régulant les comportements sociaux et anxieux et très souvent impactés dans les TSA.

Ces modifications d'abondances bactériennes relatives communes aux deux sexes co-existent avec des modifications liées au sexe telles que, par exemple, une augmentation de l'abondance relative du genre *Bacteroides* qui s'est produite spécifiquement chez les mâles issus des mères exposées aux antibiotiques (Figures 2D et 2E). Ces changements sont associés à des altérations des comportements socio-émotionnels, de manière plus marquée chez les mâles que chez les femelles, indiquant que le cerveau mâle semble être plus vulnérable que le cerveau femelle à une exposition maternelle périnatale à l'ampicilline (cf. infra). De manière intéressante, les bactéries des genres *Parabacteroides* et *Bacteroides* sont capables de synthétiser l'acide γ -aminobutyrique (GABA) (Strandwitz *et al.* 2019), principal neurotransmetteur des circuits neuronaux inhibiteurs du SNC. Il serait intéressant d'étudier si la production de GABA (ou d'autres neurotransmetteurs) par ces bactéries commensales influe sur le développement de comportements socio-émotionnels et des fonctions cérébrales associées, et ce de manière sexe-dépendante. En outre, ces différences neurocomportementales liées au sexe rappellent le dimorphisme sexuel dans la prévalence de l'autisme chez l'enfant, avec un ratio garçon/fille de 3:1 (Loomes *et al.* 2017).

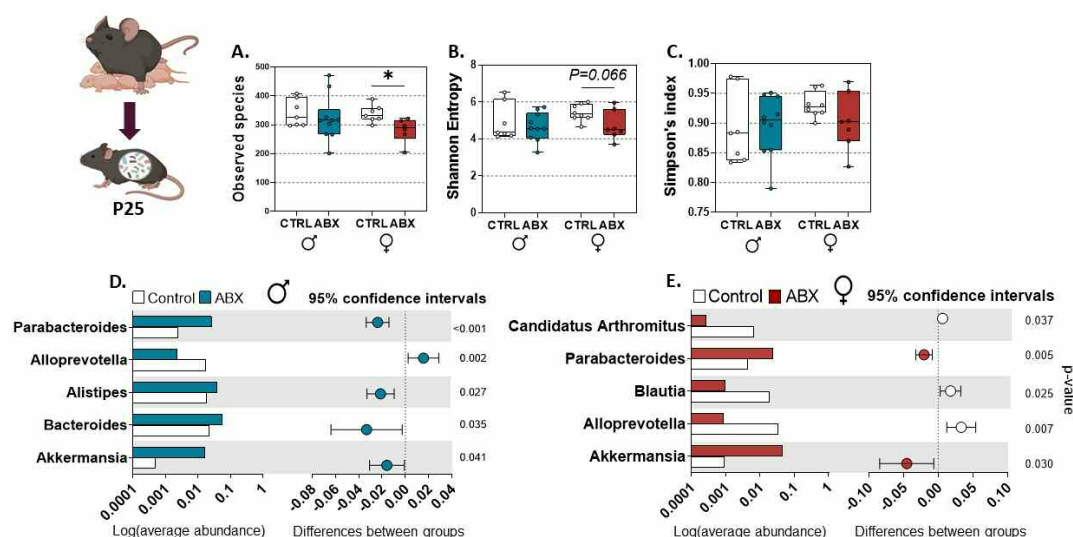


Figure 2. Une exposition périnatale à un antibiotique (ABX) altère le microbiote fécal de la progéniture. La diversité est représentée par les indices suivants : (A) nombre d'espèces observées (indice de richesse), (B) entropie de Shannon (indice de diversité basé sur l'uniformité de la distribution de l'abondance des espèces ; un indice élevé indique une plus grande diversité), et (C) indice de Simpson (indice de dominance prenant en compte l'abondance des espèces ; un indice élevé indique une plus grande diversité). (D, E) Abondances relatives (avec leurs intervalles de confiance à 95 %) des genres bactériens, montrant des changements significatifs chez les souriceaux mâles (D) et femelles (E) exposés à l'ampicilline en période périnatale (histogrammes colorés), par rapport aux groupes témoins (histogrammes blancs). Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ SEM. (A, C) * $P < 0,05$ par rapport aux souriceaux témoins ; (D, E) les valeurs de P sont indiquées sur la droite des graphiques.



LA COMMUNICATION SOCIALE EST ALTÉRÉE CHEZ LE NOUVEAU-NÉ EXPOSÉ AUX ANTIBIOTIQUES PENDANT LA PÉRIODE PÉRINATALE

Pendant la période néonatale, les souriceaux émettent des ultrasons (entre 30 et 90 kHz) lorsqu'ils sont isolés de leur mère et du reste de la portée. Les vocalisations ultrasoniques néonatales peuvent donc être considérées comme une forme précoce de communication qui augmente les chances de survie du souriceau à cette période de la vie où il est le plus vulnérable (D'Amato *et al.* 2005 ; Scattoni *et al.* 2008). Dans notre étude (Morel *et al.* 2023), les ultrasons émis après isolement de la mère et du nid ont été quantifiés et caractérisés entre le jour postnatal 3 (P3) et le jour postnatal 9 (P9). L'exposition maternelle aux antibiotiques pendant la période périnatale altère la communication ultrasonique des nouveau-nés, de manière plus marquée chez les mâles que chez les femelles. Notamment, le nombre, la durée et la fréquence des vocalisations ultrasoniques augmentent à P7 chez les mâles issus de mères traitées à l'ampicilline (Figures 3A et 3C), mais pas chez les femelles du même groupe (Figures 3B et 3D). Néanmoins, une modification de la fréquence des ultrasons émis est modifiée pour les deux sexes à P9, et à P7 uniquement pour les mâles (Figures 3E et 3F). À notre connaissance, cette étude démontre pour la première fois qu'une exposition maternelle aux antibiotiques, pendant une période périnatale étroite, induit des modifications de la communication des souriceaux dès les premiers jours de la vie. Nous avons également étudié le répertoire des vocalisations émises. À P7, on observe une surreprésentation des vocalisations de type « *step up* » chez les souriceaux mâles issus de mères traitées aux antibiotiques, par rapport aux souriceaux témoins du même âge (voir Morel *et al.* 2023). Ainsi, la perturbation du microbiote maternel par l'ampicilline pendant la période périnatale modifie non seulement la quantité mais aussi la manière dont les nouveau-nés communiquent avec leur mère et le reste de la portée. Par ailleurs, le profil de communication ultrasonique que nous observons chez les souriceaux issus de mères traitées aux antibiotiques ressemble à celui observé par Scattoni *et al.* (2008) chez la souris BTBR *tpr3tf/J*, un modèle murin d'autisme couramment utilisé pour leurs déficits sociaux et leurs stéréotypies caractéristiques des TSA. En effet, les souriceaux BTBR montrent aussi une augmentation du nombre et de la durée des vocalisations, ainsi qu'un changement similaire de leur répertoire de vocalisations (Scattoni *et al.* 2008). Ainsi, l'exposition périnatale à l'ampicilline induit des changements dans le profil de communication ultrasonique dès la période néonatale, particulièrement chez la progéniture mâle, ce qui pourrait être lié à un neurodéveloppement atypique des souriceaux.

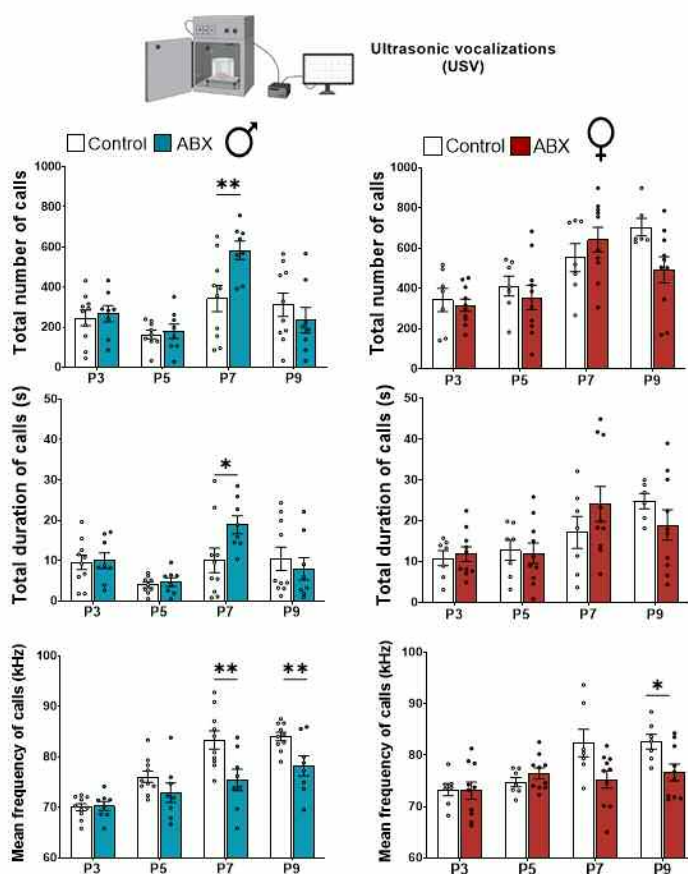


Figure 3. Une exposition périnatale à un antibiotique (ABX) modifie le profil de communication ultrasonique des souriceaux lorsqu'ils sont séparés de la mère. (A,B) nombre total des vocalisations, (C,D) durée totale des vocalisations (en secondes) et (E,F) fréquence moyenne des vocalisations ultrasoniques (USV) émises (en kHz) du jour postnatal 3 (P3) au jour postnatal 9 (P9) chez les souriceaux mâles (n=8-10 par groupe) et femelles (n=7-10 par groupe), exposés (histogrammes colorés) ou non (histogrammes blancs) à l'ampicilline en période néonatale. L'encadré du milieu montre des spectrogrammes représentatifs du répertoire de vocalisations émises par les nouveau-nés de P3 à P9 ; le temps (en secondes) est représenté sur l'axe des abscisses et la fréquence des appels est indiquée (en kHz) sur l'axe des ordonnées ; l'intensité sonore relative (en dB) est représentée par un gradient de couleur. Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ par rapport aux souriceaux témoins.



LES COMPORTEMENTS SOCIO-ÉMOTIONNELS SONT ALTÉRÉS CHEZ LE SOURICEAU JUVÉNILE EXPOSÉ AUX ANTIBIOTIQUES PENDANT LA PÉRIODE PÉRINATALE

L'exposition maternelle périnatale aux antibiotiques affecte le comportement social de la progéniture, spécifiquement chez les souriceaux mâles. En effet, les jeunes mâles issus de mères traitées à l'ampicilline montrent une diminution significative du temps d'interaction (Figure 4A) et du nombre de contacts physiques (Figure 4C) avec un congénère inconnu de même âge et de même sexe dans le test d'interaction sociale libre (*Free Social Interaction Test*, FSIT) ; de plus, le temps de latence, c'est-à-dire le temps mis à commencer à interagir avec le congénère inconnu, tend à être plus élevé (Figure 4B). Aucune différence n'est observée entre les souriceaux femelles témoins ou exposés à l'ampicilline (Figures 4G, 4H et 4I). Ces résultats sont confirmés, au moins partiellement, dans le test de nouveauté sociale à trois chambres (données non présentées). En effet, malgré le même temps passé à interagir avec le congénère inconnu que leurs homologues témoins, il semble que les mâles, mais pas les femelles, exposés à l'ampicilline ont une moindre motivation sociale (Morel *et al.* 2023). Dans l'ensemble, l'exposition maternelle périnatale à l'ampicilline semble donc réduire l'intérêt de la progéniture pour les interactions sociales, spécifiquement chez les mâles.

L'impact du traitement maternel aux antibiotiques a ensuite été évalué sur les comportements de type anxieux, à l'aide de différents tests comportementaux. Dans le test de l'*Open Field* (*Open Field test*, OFT), les mâles issus de mères exposées à l'ampicilline, mais pas les femelles du même groupe (Figures 4J, 4K et 4L), passent moins de temps (Figure 4D) et parcourent une distance plus réduite ((Figures 4E et 4F) au centre de l'arène vide de l'OFT, considéré comme une zone anxiogène par rapport à la zone périphérique (Seibenhener *et al.* 2015). Dans l'OFT, une exposition maternelle à l'ampicilline induit donc une augmentation du comportement de type anxieux, spécifiquement chez les souriceaux mâles. À l'inverse, ces souriceaux mâles éprouvent moins de stress que leurs homologues témoins dans deux autres tests évaluant le comportement de type anxieux, à savoir les tests de la boîte clair/obscur et du labyrinthe en croix surélevée (Morel *et al.* 2023 ; données non présentées ici), alors que, là encore, aucune différence n'est observée entre les femelles témoins et celles ayant été exposées à l'ampicilline. La différence de nature des stimuli anxiogènes à la base de ces différents tests (Ramos 2008) pourrait expliquer la divergence des résultats obtenus dans notre étude. Au total, le traitement antibiotique maternel en période périnatale affecte le comportement de type anxieux de la progéniture juvénile, mais de manière différente selon le contexte et le sexe. Enfin, ce traitement n'impacte pas l'activité locomotrice de la progéniture (Morel *et al.* 2023 ; données non présentées ici).

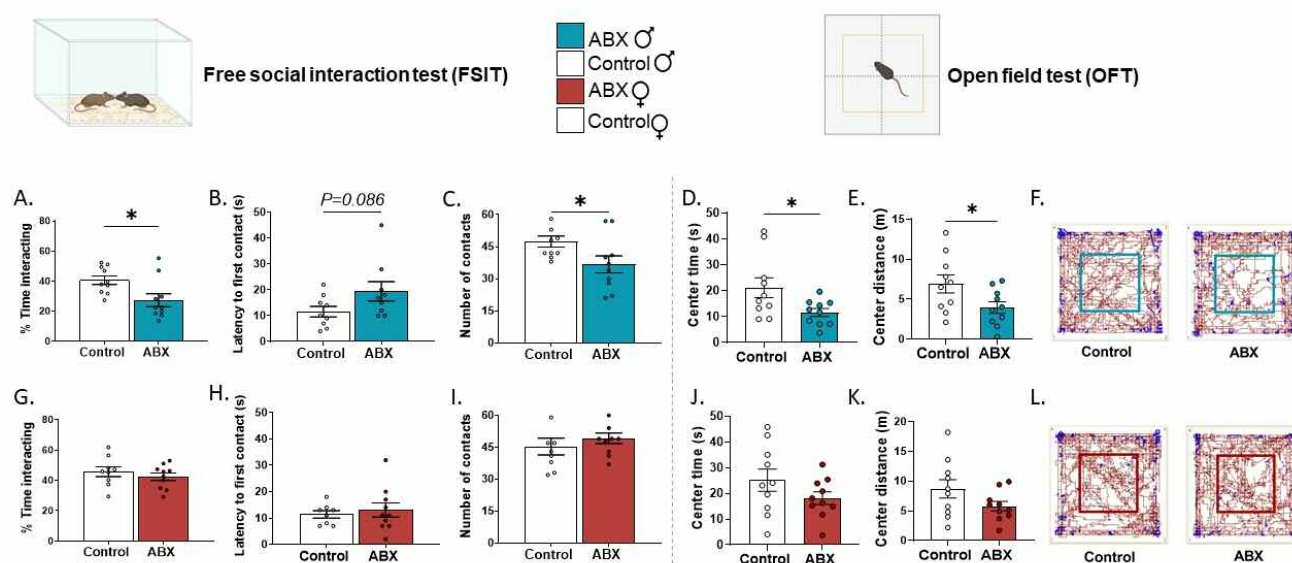


Figure 4. Une exposition périnatale à un antibiotique (ABX) affecte les comportements socio-émotionnels chez la souris juvénile, de manière différente selon le sexe et le contexte anxiogène. Test d'interaction sociale libre (FSIT) : (A,G) temps passé à interagir (en % du temps total du test) ; (B,H) latence pour établir le premier contact physique (en secondes) ; (C,I) nombre de contacts directs avec un congénère inconnu. Test de l'*Open Field* (OFT) : (D,J) temps passé dans la zone centrale anxiogène ; (E,K) distance parcourue dans la zone centrale anxiogène ; (F,L) représentation des déplacements des animaux, suivis et cartographiés par videotracking, dans l'arène de l'OFT. Les différentes variables ont été quantifiées chez les mâles ($n=8-10$ par groupe) et les femelles ($n=7-10$ par groupe) exposés (histogrammes colorés), ou non (histogrammes blancs), à l'ampicilline en période néonatale. Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ SEM. * $P<0,05$ par rapport aux souriceaux témoins.

De manière intéressante, ce profil comportemental – réduction des comportements sociaux et de type anxieux à l'adolescence – est semblable à celui observé chez des souris adolescentes exposées à la pénicilline de la dernière semaine de gestation jusqu'au sevrage (Leclercq *et al.* 2017). Une autre étude, dans laquelle les souriceaux sont exposés à la pénicilline durant la 3^e semaine postnatale, démontre des altérations des comportements socio-émotionnels similaires, à l'âge adulte, particulièrement chez les mâles (Kayyal *et al.* 2020). Dans ces deux études, les modifications comportementales sont associées à des altérations significatives



du microbiote de la progéniture (Leclercq *et al.* 2017 ; Kayyal *et al.* 2020). Malgré la variabilité des conditions expérimentales entre les études (*e.g.* la durée, la dose et la nature de ou des antibiotiques, la fenêtre d'exposition choisie, l'âge du test, etc.), qui invitent à prendre des précautions dans l'interprétation des effets à long terme des antibiotiques, l'exposition précoce aux pénicillines semble avoir un impact sur les comportements sociaux et de type anxieux, au stade prépubère et à l'âge adulte.

UNE MODIFICATION DE L'EXPRESSION CENTRALE DES RÉCEPTEURS DE L'OCYTOCINE EST-ELLE ASSOCIÉE À CES EFFETS NEUROCOMPORTEMENTAUX ?

L'ocytocine (OXT) est un neuropeptide fortement conservé entre les espèces, exprimé et sécrété par l'hypothalamus. Elle a de nombreuses fonctions périphériques comme la parturition et l'éjection du lait lors de l'allaitement. Ce neuropeptide est aussi primordial au niveau central, puisqu'il favorise les comportements sociaux, facilite l'adaptation au stress et contribue à la réduction de l'anxiété (Grinevich & Neumann 2021). Ces fonctions sont permises notamment par l'expression de son récepteur, le récepteur à l'ocytocine (OXTR), dans des zones cérébrales cruciales pour la régulation des comportements socio-émotionnels, tels que l'amygdale, le cortex préfrontal et l'hypothalamus (Jurek & Neumann 2018). Étant donné les altérations des comportements socio-émotionnels observées dans notre étude, nous avons recherché si le traitement antibiotique maternel avait un impact sur l'expression génique de ce neuropeptide et celle de son récepteur. Bien qu'une exposition maternelle à l'ampicilline pendant la période périnatale n'ait pas affecté l'expression de l'OXT dans l'hypothalamus ni celle de son récepteur dans l'amygdale (le centre régulateur de la peur et de l'anxiété, voir Morel *et al.* 2023), nous avons observé une réduction de l'expression de l'OXTR dans le cortex préfrontal des souriceaux issus des mères traitées à l'ampicilline, de manière plus marquée chez les mâles que chez les femelles (Figure 5). Ces résultats démontrent que le système ocytocinergique, via l'OXTR dans le cortex préfrontal, pourrait être à l'origine des déficits sociaux observés chez ces mêmes animaux.

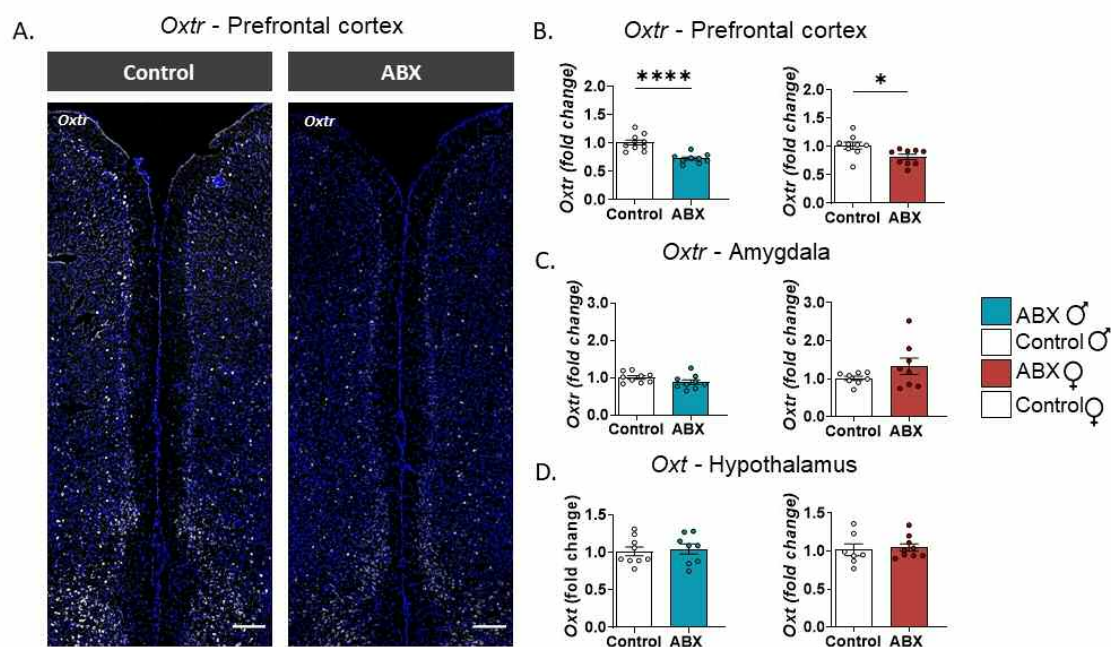


Figure 5. Une exposition périnatale à un antibiotique (ABX) entraîne une réduction de l'expression du gène codant le récepteur pour le l'ocytocine (Oxtr) dans le cortex préfrontal des souriceaux prépubères. A : la différence d'expression du gène Oxtr est visualisable qualitativement par marquage in situ des ARNm dans le cortex préfrontal de mâles issus du groupe témoin (control, à gauche) et de mâles issus de mères traitées à l'ampicilline (ABX, à droite). B-D : les niveaux d'expression du gène Oxtr dans le cortex préfrontal (B) et l'amygdale (C) et du gène Oxt dans l'hypothalamus (D) ont été quantifiés par RT-qPCR, chez les mâles (graphiques situés à gauche) et femelles (graphiques situés à droite) du groupe témoin (histogrammes blancs) ou du groupe exposé à l'ampicilline (histogrammes colorés). Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ SEM. * $P < 0,05$; **** $P < 0,0001$ par rapport aux souriceaux témoins. Barres d'échelle (A) : 200 μ m.

La littérature actuelle indique que le système ocytocinergique pourrait être un médiateur indispensable dans les voies de communication de l'axe microbiote-intestin-cerveau, en particulier au cours du développement postnatal. En effet, il a récemment été démontré que l'administration orale du probiotique *Limosilactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) permettait d'améliorer les déficits de comportements sociaux dans des modèles murins génétiques et environnementaux de l'autisme (Sgritta *et al.* 2019). Cette action prosociale de *L. reuteri* dépendrait du nerf vague, lui-même activant les connexions centrales du système de récompense dopaminergique avec les neurones hypothalamiques à ocytocine, menant par conséquent à une amélioration des comportements sociaux murins (Sgritta *et al.* 2019). Par ailleurs, il a été récemment démontré que le système ocytocinergique dans le cortex préfrontal régulait les comportements sociaux et les comportements de type anxieux de manière différente selon le sexe (Nakajima *et al.* 2014 ; Li *et al.* 2016). Notamment, les auteurs ont montré qu'une population d'interneurones du cortex préfrontal exprimant



l'OXTR, favorisait les comportements sociaux et socio-sexuels chez la souris femelle, mais pas chez le mâle ; alors qu'ils réduisent les comportements de type anxieux chez les souris mâles, mais pas chez les femelles. À la suite de notre étude, il serait donc intéressant de vérifier (i) si une exposition périnatale aux antibiotiques altère le développement et la fonction de cette population spécifique d'interneurones ; et (ii) si ces interneurones pourraient contribuer aux altérations comportementales sexe-spécifiques observées dans notre étude.

L'EXPOSITION PÉRINATALE AUX ANTIBIOTIQUES COMPROMET-ELLE L'INTÉGRITÉ DES BARRIÈRES PHYSIOLOGIQUES DE L'AXE MICROBIOTE-INTESTIN-CERVEAU ?

Par ailleurs, nous avons montré que l'altération des comportements socio-émotionnels après exposition périnatale à l'ampicilline est vraisemblablement associée à une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE), comme en témoigne la diminution de l'expression de gènes codant pour des protéines des jonctions serrées dans le cortex préfrontal de la progéniture exposée aux antibiotiques (Figures 6A et 6B). Cet effet du traitement est plus marqué chez les mâles que les femelles. Néanmoins, cette exposition périnatale à l'ampicilline ne semble pas impacter la barrière intestinale de la progéniture, comme le montrent les mêmes analyses dans la muqueuse du côlon (Figures 6C et 6D).

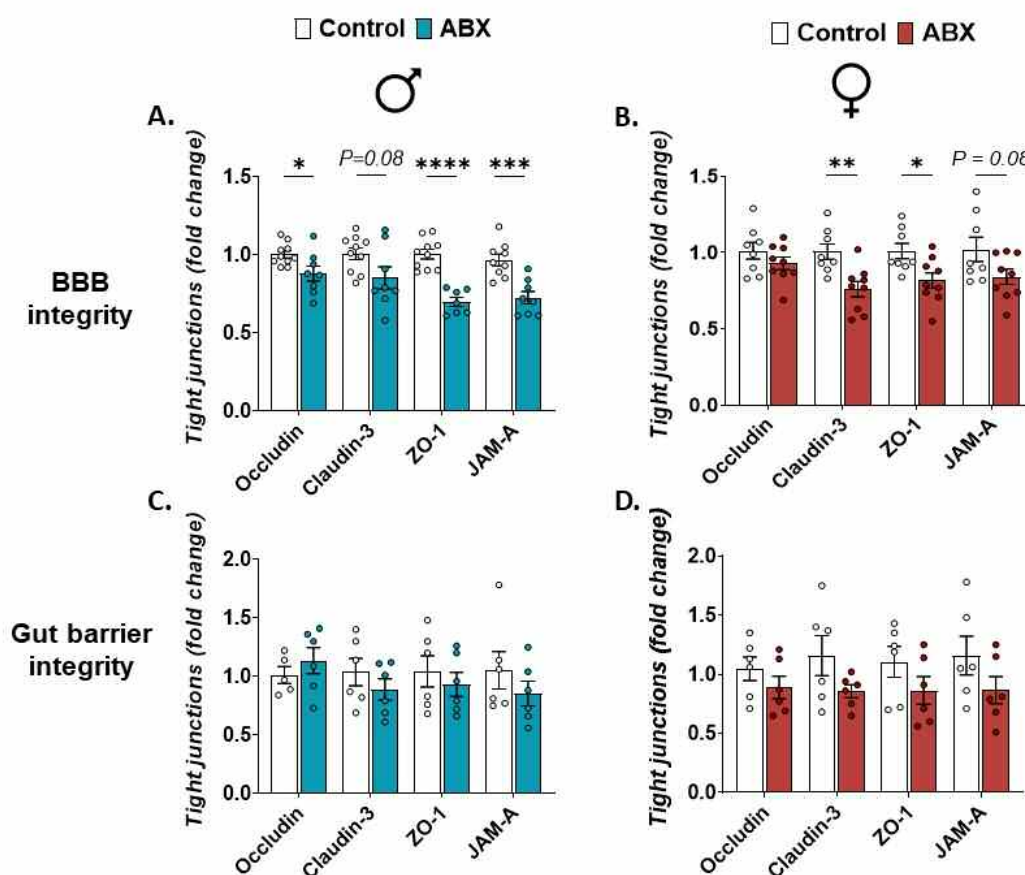


Figure 6. Une exposition périnatale à un antibiotique (ABX) affecte l'expression de gènes impliqués dans la barrière hémato-encéphalique du cortex préfrontal (blood-brain-barrier [BBB] integrity) mais pas celle de gènes impliqués dans la barrière intestinale (gut barrier integrity). A-B : expression de gènes des protéines de jonctions serrées dans le cortex préfrontal (A : mâles ; B : femelles) et dans le côlon (C : mâles, D : femelles) chez les souriceaux exposés (histogrammes colorés), ou non (histogrammes blancs), à l'ampicilline pendant la période périnatale. Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ par rapport aux souriceaux témoins.

À ce jour, peu d'études précliniques ont exploré l'impact d'un traitement antibiotique dans des conditions pertinentes cliniquement. Néanmoins, certains travaux similaires au nôtre (Leclercq *et al.* 2017 ; Kayyal *et al.* 2020) démontrent des modifications de la perméabilité de la BHE, associées à des altérations des comportements socio-émotionnels. Ainsi, une exposition à la pénicilline V au début de la vie altère l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique dans des régions cérébrales régulant la motivation sociale, comme l'hippocampe et le cortex frontal (Leclercq *et al.* 2017 ; Kayyal *et al.* 2020). En particulier, une exposition postnatale à cet antibiotique entraîne une diminution de l'expression de gènes codant des protéines de jonctions serrées (Occludin et Claudin-5) dans l'hippocampe et le cortex frontal (Kayyal *et al.* 2020), de manière similaire à ce que nous avons observé dans le PFC, correspondant lui-même à la région la plus antérieure du cortex frontal (Morel *et al.* 2023). Néanmoins,



une exposition à la pénicilline V pendant une période périnatale longue (du 13^e jour embryonnaire au sevrage) induit l'augmentation de l'expression génique de ces mêmes protéines de jonctions serrées dans l'hippocampe, que les auteurs interprètent comme un mécanisme de protection contre une neuroinflammation potentielle après traitement antibiotique (Leclercq *et al.* 2017). En effet, dans cette étude, l'exposition périnatale longue à la pénicilline V induit une augmentation significative de l'expression de cytokines anti-inflammatoires (IL-6 et IL-10) dans le cortex frontal, dont la BHE n'est pas affectée par le traitement antibiotique, alors qu'aucun changement du profil cytokinique ne se produit dans l'hippocampe, là où l'expression des jonctions serrées augmente. Par contraste, une exposition postnatale au même antibiotique favoriserait une inflammation centrale, par augmentation de l'activation des cellules dendritiques et des cellules présentatrices d'antigènes, associée à une diminution des populations de lymphocytes T régulateurs (Kayyal *et al.* 2020). Ainsi, bien que l'influence des cytokines inflammatoires sur l'expression des jonctions serrées de la BHE ait déjà été bien démontrée (Haute Autorité de Santé 2017), celle du microbiote intestinal sur ce phénomène physiologique et les mécanismes sous-jacents au début de la vie restent encore à déterminer. Par ailleurs, ces différences d'effets sur la BHE interrogent sur l'existence de fenêtres temporelles critiques de la période périnatale pendant lesquelles une exposition antibiotique pourrait être à risque pour le développement et la perméabilité de la BHE.

CONCLUSION

En conclusion, une exposition à l'ampicilline pendant une fenêtre étroite de la période périnatale induit des effets physiologiques et neurocomportementaux significatifs chez la progéniture, à la fois aux stades néonatal et juvénile. En particulier, appliqué dans des conditions pertinentes cliniquement, entraîne une perturbation de la composition du microbiote intestinal des souriceaux, caractérisée par une diminution de la diversité bactérienne et une modification des abondances relatives de certains groupes bactériens. Au cours de la période néonatale, la progéniture exposée a montré une altération de sa communication sociale par ultrasons. Au cours de la période juvénile, elle a présenté des altérations des comportements socio-émotionnels. Nombre de ces modifications dépendaient du sexe, affectant plus souvent ou plus fortement les individus mâles. Nous avons montré que ces altérations comportementales étaient associées à une réduction significative (i) de l'expression génique d'OXTTR dans le cortex préfrontal, connu pour être impliqué dans la régulation des comportements socio-émotionnels ; (ii) de l'expression génique des protéines des jonctions serrées, toujours dans le cortex préfrontal, indiquant une augmentation possible de la perméabilité de la BHE dans cette région cérébrale.

Bien que l'administration prophylactique de pénicillines soit nécessaire en cas de suspicion d'infection périnatale ou nosocomiale, potentiellement fatale à la naissance (Haute Autorité de Santé 2017), nous, et d'autres auteurs, démontrons qu'une exposition maternelle ou directe aux antibiotiques, au cours d'une période périnatale étroite, pourrait être délétère pour le développement et la fonction de l'axe microbiote-intestin-cerveau. En particulier, (i) des doses cliniquement pertinentes d'antibiotiques à large spectre au début de la vie pourraient constituer un facteur de risque de l'émergence de troubles neurodéveloppementaux comme les TSA ; (ii) il existe des variations dans les résultats neurocomportementaux en fonction du moment de l'exposition aux antibiotiques et de la dose administrée au début de la vie ; et (iii) dans un contexte clinique où 3 fois plus de garçons que de filles font l'objet d'un diagnostic d'autisme (Loomes *et al.* 2017), les changements physiologiques et comportementaux dépendant du sexe mis en évidence dans notre étude interrogent sur une plus forte vulnérabilité masculine à une perturbation de la colonisation du microbiote intestinal et sa contribution comme facteur de risque de troubles du neurodéveloppement.

CONFLITS D'INTÉRÊTS

L'auteur déclare qu'elle n'a aucun conflit d'intérêt.

COMITÉ D'ÉTHIQUE

Toutes les expériences ont été menées conformément à un protocole approuvé par le Comité d'éthique pour la recherche animale de Stockholm Nord et conformément à la directive du Conseil des Communautés européennes du 24 novembre 1986 (86/609/CEE).

RÉFÉRENCES

- Arentsen T. Gut microbes and the developing brain. Karolinska Institutet, Stockholm, 2017. <https://libris.kb.se/bib/20224343?vw=short>. Consulté le 14 août 2025.
- Arentsen T, Qian Y, Gkotsis S, Femenia T, Wang T, Udekwi K *et al.* The bacterial peptidoglycan-sensing molecule Pglyrp2 modulates brain development and behavior. *Mol Psychiatry*. 2017; 22: 257–266
- Borre YE, O'Keeffe GW, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends Mol Med*. 2014; 20: 509–518
- Cryan JF, O'Riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu KV, Bastiaansen TFS, Boehme M *et al.* The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev*. 2019; 99: 1877–2013



Bull. Acad. Vét. France — 2025

<http://www.academie-veterinaire-defrance.org/>

- D'Amato FR, Scalera E, Sarli C, Moles A. Pups Call, Mothers Rush: Does Maternal Responsiveness Affect the Amount of Ultrasonic Vocalizations in Mouse Pups? *Behav Genet.* 2005; 35: 103–112
- Diaz Heijtz R. Fetal, neonatal, and infant microbiome: Perturbations and subsequent effects on brain development and behavior. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2016; 21: 410–417
- Diaz Heijtz R, Wang S, Anuar F, Qian Y, Björkholm B, Samuelsson A *et al.* Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011; 108: 3047–3052
- Dieterich W, Schink M, Zopf Y. Microbiota in the Gastrointestinal Tract. *Medical Sciences.* 2018; 6: 116
- Firestein MR, Myers MM, Austin J, Stark RI, Barone JL, Ludwig RJ *et al.* Perinatal antibiotics alter preterm infant EEG and neurobehavior in the Family Nurture Intervention trial. *Dev Psychobiol.* 2019; 61: 661–669
- Golubeva AV, Joyce SA, Moloney G, Burokas A, Sherwin E, Arbolea S *et al.* Microbiota-related Changes in Bile Acid & Tryptophan Metabolism are Associated with Gastrointestinal Dysfunction in a Mouse Model of Autism. *EBioMedicine.* 2017; 24: 166–178
- Grinevich V. & Neumann ID. Brain oxytocin: how puzzle stones from animal studies translate into psychiatry. *Mol Psychiatry.* 2021; 26: 265–279
- Haute Autorité de Santé, H.A.S. Label de la HAS – Prise en charge du nouveau-né à risque d'infection néonatale bactérienne précoce (≥34 SA). 2017.
https://www.has-sante.fr/jcms/c_2803349/fr/label-de-la-has-prise-en-charge-du-nouveau-ne-a-risque-d-infection-neonatale-bacterienne-precoce-34-sa. Consulté le 14 août 2025
- Iglesias-Vázquez L, Van Ginkel Riba G, Arija V, Canals J. Composition of Gut Microbiota in Children with Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients.* 2020; 12: 792
- Jurek B. & Neumann ID. The Oxytocin Receptor: From Intracellular Signaling to Behavior. *Physiol Rev.* 2018; 98: 1805–1908
- Kayyal M, Javkar T, Firoz Mian M, Binyamin D, Koren O, McVey Neufeld KA *et al.* Sex dependent effects of post-natal penicillin on brain, behavior and immune regulation are prevented by concurrent probiotic treatment. *Sci Rep.* 2020; 10: 10318; Erratum in *Sci Rep.* 2020; 10: 18355
- Lavebratt C, Yang LL, Giacobini M, Forsell Y, Schalling M, Partonen T. *et al.* Early exposure to antibiotic drugs and risk for psychiatric disorders: a population-based study. *Transl Psychiatry.* 2019; 9: 317
- Leclercq S, Mian FM, Stanis AM, Bindels LB, Cambier E, Ben Amram H *et al.* Low-dose penicillin in early life induces long-term changes in murine gut microbiota, brain cytokines and behavior. *Nat Commun.* 2017; 8: 15062
- Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S *et al.* An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol.* 2014; 32: 834–841
- Li K, Nakajima M, Ibañez-Tallon I, Heintz N. A Cortical Circuit for Sexually Dimorphic Oxytocin-Dependent Anxiety Behaviors. *Cell.* 2016; 167: 60–72.e11
- Loomes R, Hull L, Mandy WPL. What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2017; 56: 466–474
- Morel C, Martinez Sanchez I, Cherifi Y, Chartrel N, Diaz Heijtz R. Perturbation of maternal gut microbiota in mice during a critical perinatal window influences early neurobehavioral outcomes in offspring. *Neuropharmacology.* 2023;229: 109479
- Nakajima M, Görlich A., Heintz N. Oxytocin Modulates Female Sociosexual Behavior through a Specific Class of Prefrontal Cortical Interneurons. *Cell.* 2014; 159: 295–305
- Neufeld KM, Kang N, Bienenstock J, Foster JA. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice: Behavior in germ-free mice. *Neurogastroenterol Motil.* 2011; 23: 255–e119.
- Neuman H, Forsythe P, Uzan A, Avni O, Koren O. Antibiotics in early life: dysbiosis and the damage done. *FEMS Microbiol Rev.* 2018; 42: 489–499
- Njotto LL, Simin J, Fornes R, Odsbu I, Mussche I, Callens S *et al.* Maternal and Early-Life Exposure to Antibiotics and the Risk of Autism and Attention-Deficit Hyperactivity Disorder in Childhood: a Swedish Population-Based Cohort Study. *Drug Saf.* 2023; 46: 467–478
- Ramos A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends Pharmacol Sci.* 2008; 29: 493–498
- Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I *et al.* Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr.* 2018; 57:1–24
- Scattoni ML, Gandhi SU, Ricceri L, Crawley JN. Unusual repertoire of vocalizations in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. *PLoS One.* 2008; 3: e3067
- Seibenhener ML & Wooten MC. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *J Vis Exp.* 2015; 96: e52434
- Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 2016; 14: e1002533
- Sgritta M, Dooling SW, Buffington SA, Momin EN, Francis MB, Britton RA *et al.* Mechanisms Underlying Microbial-Mediated Changes in Social Behavior in Mouse Models of Autism Spectrum Disorder. *Neuron.* 2019; 101: 246–259.e6
- Slykerman RF, Coomarasamy C, Wickens K, Thompson JMD, Stanley TV, Barthow C *et al.* Exposure to antibiotics in the first 24 months of life and neurocognitive outcomes at 11 years of age. *Psychopharmacology (Berl).* 2019; 236: 1573–1582
- Strandwitz P, Kim KH, Terekhova D, Liu JK, Sharma A, Levering J *et al.* GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota. *Nat Microbiol.* 2019; 4: 396–403
- Sun Y, Zhu H, Cheng R, Tang Z, Zhang M. Outer membrane protein Amuc_1100 of *Akkermansia muciniphila* alleviates antibiotic-induced anxiety and depression-like behavior in mice. *Physiol Behav.* 2023; 258: 114023
- Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res.* 2020; 30: 492–506

